ПАРАЗИТОЛОГИЯ, XVII, 4, 1983

УДК 576.895.122 : 591.12 : 577.1

ФУМАРАТРЕДУКТАЗА В МИТОХОНДРИЯХ ТРЕМАТОДЫ CALICOPHORON IJIMAI

Г. В. Ярыгина, Н. П. Выхрестюк, Э. А. Буренина

Биолого-почвенный институт ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Митохондрии трематоды *Calicophoron ijimai* обладают активной фумаратредуктазной системой. Исследовано влияние некоторых ингибиторов дыхательной цепи и ряда антгельминтных препаратов на активность фумаратредуктазы.

Митохондрии кишечных гельминтов обладают специфическим типом анаэробного энергетического метаболизма (Köhler, 1977). Они приобрели способность к функционированию дикарбонового участка цикла Кребса в анаэробных условиях. При этом реакции цикла обращены. Дыхательная цепь у этих гельминтов включает иные звенья, чем у позвоночных животных (Soprunov, 1978). Одной из наиболее важных реакций цепи переноса электронов у них является связанное с НАДН восстановление фумарата в сукцинат с помощью флавинзависимой фумаратредуктазы (ФР). Эта реакция сопряжена с фосфорилированием (Saz, 1971; Cheah, 1974; van Vugt e. a., 1976; Soprunov, 1978). Она приводит к генерированию эквивалентов НАДН, образованию АТФ и важного метаболита — сукцината. Поэтому свойства ФР из различных червей тщательно изучались (Zoeten, Tipker, 1969; Бенедиктов, 1971; van Vugt e. a., 1976; Fioravanti, Saz, 1978).

Целью нашей работы было определение активности и изучение свойств ФР у трематоды *Calicophoron ijimai* (Fukui, 1922) Näsmark, 1937 (Trematoda, Paramphistomidae) (syn. *Calicophoron erschowi*, Davidova, 1959), паразитирующей в рубце крупного рогатого скота и наносящей большой вред животноводству Дальнего Востока, а также установление возможности ингибирования ФР системы некоторыми препаратами, обладающими антгельминтной активностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

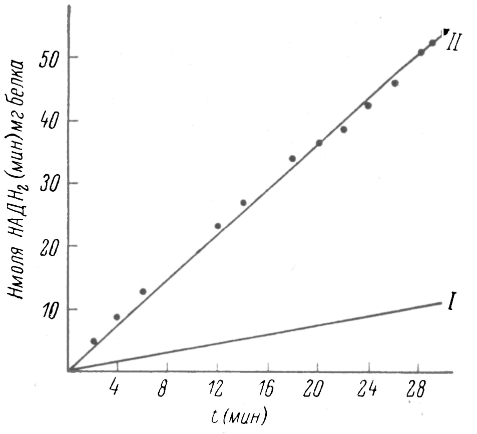
Взрослых трематод *C. ijimai* собирали из свежезабитых коров, промывали средой Гедона—Флейга, подсушивали между листами фильтровальной бумаги. Червей затем растирали в агатовой ступке в замороженном состоянии и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в ледяной среде, состоящей из 0.25 М раствора сахарозы, 0.05 М трис, 0.005 М ЭДТА и 0.15%-ного альбумина при pH 7.5. Полученный гомогенат центрифугировали при 1°С при 1000 g в течение 15 мин. Осадок, содержащий ядра и обломки клеток, отбрасывали, полученный супернатант фильтровали через мельничный газ и из фильтрата осаждали митохондрии центрифугированием при 15 000 g в течение 20 мин при 1°. Митохондрии дважды промывали средой выделения, не содержащей альбумина, суспендировали в этой же среде и использовали как источник энзима. Чистоту митохондриальной фракции проверяли с помощью электронного микроскопа.

Активность ФР определяли спектрофотометрическим методом по изменению поглощения восстановленного НАД при 340 нм в присутствии фумарата за

30 мин (Prichard, Schofield, 1968). Полная реакционная смесь содержала в конечном объеме 3 мл: 75 мкмолей трис-HCL буфера pH 8.0, 1 мкмоль НАДН, 1мкмоль фумарата, 0.3—0.6 мг митохондриального белка. До конечного объема пробу доводили средой выделения, не содержащей альбумина. Активность фермента выражали в нмолях окисленного НАД в мин на мг белка, используя для расчета коэффициент экстинкции восстановленных нуклеотидов (Horecker, Kornberg, 1948). Белок определяли по Лоури (Lowry e. a., 1951). Препараты, обладающие антгельминтной активностью, вносили в пробу в растворе этанола, параллельно ставили контроль на спирт, чтобы исключить ингибиторное влияние спирта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Митохондрии, выделенные из *C. ijimai*, способны окислять НАДН, причем окислительная способность их почти в 5 раз возрастает при добавлении фумарата (табл. 1, рис. 1), что свидетельствует о наличии активной ФР системы. Насыщение субстратом наступает при содержании 0.3 мМ фумарата в пробе, дальнейшее повышение концентрации фумарата к возрастанию активности фермента не приводит. Температура 20—25 °С оптимальна для действия фермента. Скорость окисления НАДН линейна во времени (рис. 1); это, вероятно, является следствием того, что мы работали с интактными митохондриями, не разрушая мембранные оболочки специальными методами. Активность ФР максимальна при pH 8.0 (рис. 2).



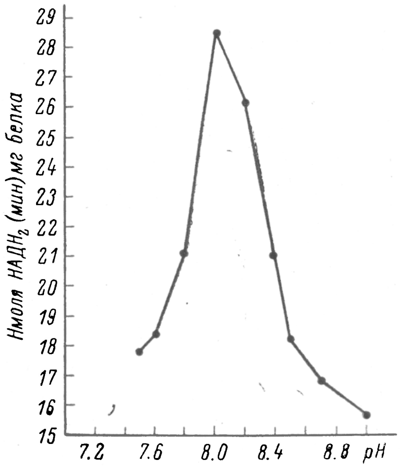


Рис. 1. Окисление восстановленного НАД митохондриями *C. ijimai*.

I — эндогенное окисление $НАДН_2$ (без добавления фумарата); *II* — окисление $НАДН_2$ в присутствии фумарата. Полная реакционная смесь содержала (в мкмолях/3 мл): трис-HCl, буфер pH 8.0 — 75, $НАДН_2$ — 1 белок — 0.3—0.6 мг, фумарат натрия — 1.

Рис. 2. Влияние pH среды на активность фумаратредуктазы в митохондриях *C. ijimai*.

Полная реакционная смесь содержала (в мкмолях/3 мл): трис-HCl с разными значениями pH — 75, НАДН — 1, фумарат натрия — 1, белок — 0.3—0.6 мг.

Величина ФР активности в различных партиях червей может существенно изменяться. Максимальная величина активности в наших опытах составила 47.7±1.0 нмолей/мин на мг белка, минимальная — 15.0±0.1 нмоля.

Добавление к опытной пробе KCN приводит к заметному снижению активности (табл. 1). Сукцинат лишь незначительно тормозит активность ФР у *C. ijimai*. Активность фермента сильно снижается при добавлении к реакционной смеси малоната (табл. 1), почти полностью тормозится парахлормеркурибензоатом (п-ХМБ), азид натрия угнетает ее наполовину.

Известно, что битионол является эффективным антгельминтиком против парамфистоматид крупного рогатого скота (Васильев и др., 1967). Поэтому мы изучили влияние некоторых препаратов, обладающих антгельминтной активностью, на ФР систему из *C. ijimai* в сравнении с влиянием на нее битионола (табл. 2). Битионол, являющийся производным бисфенолов, в концентрации

Таблица 1

Влияние ингибиторов на фумаратредуктазную активность митохондрий трематоды *Calicophoron ijimai*

Ингибитор	Содержание ингибитора (мкмоли)	Активность ФР (нмоли/мин/мг белка)	% ингибирования
НАДН		9.7±0.2	
НАДН+фумарат		57.4±0.4	
НАДН+фумарат+KCN	1	40.3±0.7	15.5
Тот же	2	40.1±0.9	16.1
»	3	32.8±0.8	31.3
НАДН+фумарат		15.5±0.2	
НАДН+фумарат+сукцинат	10	15.3±0.4	1.4
Тот же	20	14.5±0.2	6.5
»	30	12.8±0.3	17.4
НАДН+фумарат		15.0±0.1	
НАДН+фумарат+малонат	10	9.7±0.1	35.2
Тот же	20	5.1±0.1	66.1
»	30	4.8±0.1	67.7
НАДН+фумарат		15.7±0.3	
НАДН+фумарат+п-ХМБ	5	0.3	98.2
НАДН+фумарат+азид натрия	5	7.4±0.1	52.7

Таблица 2

Влияние антгельминтных препаратов на фумаратредуктазу митохондрий *Calicophoron ijimai*

Антгельминтик	Концентрация антгельминтика (М)	Активность (нмоли/мин/мг белка)	% ингибирования
НАДН+фумарат		32.7±0.9	
НАДН+фумарат+битионол	$1 \cdot 10^{-6}$	20.4±0.3	37.8
Тот же	$5 \cdot 10^{-6}$	19.0±0.5	41.8
»	$1 \cdot 10^{-5}$	0.48	98.5
НАДН+фумарат		23.6±0.3	
НАДН+фумарат+оксинид	$1 \cdot 10^{-6}$	26.1±0.1	Не ингибируется
Тот же	$5 \cdot 10^{-6}$	25.4±0.6	»
»	$1 \cdot 10^{-5}$	26.2±2.2	»
НАДН+фумарат		12.1±0.2	
НАДН+фумарат+Г-937	$1 \cdot 10^{-6}$	4.4±0.3	74.9
Тот же	$5 \cdot 10^{-6}$	1.5±0.1	91.5
»	$1 \cdot 10^{-5}$	0.7	96.3
НАДН+фумарат		17.5±0.3	
НАДН+фумарат+Г-1026	$1 \cdot 10^{-6}$	0.6±0.2	95.1
Тот же	$5 \cdot 10^{-6}$	0.2±0.1	98.4
»	$1 \cdot 10^{-5}$	0	100
НАДН+фумарат		47.7±1.0	
НАДН+фумарат+тиабендазол	$1 \cdot 10^{-5}$	45.7±0.3	4.2
Тот же	$1 \cdot 10^{-4}$	45.4±0.8	4.8
»	$1 \cdot 10^{-3}$	34.0±1.0	28.7

$1 \cdot 10^{-5}$ М почти полностью угнетает окисление фумарата митохондриями *C. ijimai*. Такое же действие оказывают препараты Г-937 и Г-1026, являющиеся производными салициланилидов (Михайлицын и др., 1981).

Оксинид, являющийся нитропроизводным битионола, не оказывает ингибирующего действия на активность фумаратредуктазы каликофоронов. Тиабендазол, являющийся сильным ингибитором ФР у нематод, оказал лишь слабое действие на ФР из *C. ijimai*. В концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М он ингибировал активность фермента лишь на 28.7% (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митохондрии *C. ijimai* обладают фумаратредуктазной системой, так как окисление НАДН ими при добавлении фумарата возрастает почти в 5 раз. Об этом же свидетельствует и торможение окисления фумарата малонатом (табл. 1). Малоновая кислота является структурным аналогом фумар кислоты, внесенная в реакционную смесь, она конкурирует за активный центр фермента. Сукцинат, конечный продукт ФР реакции, также оказывает ингибирующее действие. Заметное торможение начинается с концентрации 20 мкМ (табл. 1). В этом отношении ФР из *C. ijimai* отличается от аналогичного фермента *Fasciola hepatica*, на активность которого, по данным Бенедиктова (1971), слабо влияет малонат, а сукцинат даже в концентрации $3.3 \cdot 10^{-3}$ М не тормозит реакцию.

Таким образом, митохондрии *C. ijimai* способны к транспорту электронов через дыхательную цепь, где конечным акцептором электронов является фумаровая кислота. Косвенным доказательством этого является и состав конечных продуктов. Преобладающими конечными продуктами являются летучие жирные кислоты, среди них основной является пропионовая кислота. Пропионат, как известно, образуется в тканях беспозвоночных через фумаратредуктазную систему (Хочачка и Сомеро, 1977; Soprunov, 1978).

Впервые предположение об особой роли фумаратредуктазной системы в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в тканях гельминтов, было высказано Бюдингом (Bueding, 1962). Позднее присутствие ФР системы было продемонстрировано в тканях трематод (Бенедиктов, 1971, 1974; Fioravanti, Saz, 1978). Присутствие такой системы показано также и в моллюсках — факультативных анаэробах (Хочачка и Сомеро, 1977). Такой путь у беспозвоночных-анаэробов выработался в процессе эволюции как следствие приспособления к анаэробным условиям. Предполагается, что перенос электронов на фумарат сопряжен с фосфорилированием. Косвенным подтверждением этого в наших опытах служит ингибирование транспорта электронов на фумарат препаратами Г-937 и Г-1026 (табл. 2), являющимися салициланилидами. Салициланилиды, как известно, разобщают окислительное фосфорилирование. Сопряжение фумаратредуктазной реакции с фосфорилированием в других гельминтах было показано прямыми методами (Köhler, Saz, 1976; Saz, 1971; van Vugt e. a., 1976).

Активный перенос электронов в *C. ijimai* почти полностью тормозится п-ХМБ. Этот ингибитор обычно тормозит активность флавиновых дегидрогеназ, входящих в электронпереносящую цепь гельминтов (Soprunov, 1978). Поэтому можно предполагать, что транспорт электронов у *C. ijimai* идет через флавиновые дегидрогеназы, как и у других гельминтов (Saz, 1971; Zoeten e. a., 1969; Бенедиктов, 1974).

Активность ФР тормозится KCN и азидом натрия. Эти ингибиторы обычно блокируют дыхательную цепь на уровне цитохромов «а». Поэтому можно было бы предположить, что цепочка тканевого дыхания *C. ijimai* включает цитохромы «а». Однако было бы неправильно трактовать отрывочные данные, полученные у гельминтов, исходя из цепочки тканевого дыхания у позвоночных (Soprunov, 1978). В последнее время у гельминтов обнаружены необычные для позвоночных переносчики электронов такие, как родохинон, витамин К, цитохром «О». Витамин К играет роль отсутствующего убихинона, цитохром «О» катализирует перенос электронов на O_2 по типу независимого от pO_2 дыхания (Soprunov, 1978; Cheah, 1967; Bryant, Nicholas, 1966), т. е. у кишечных гельминтов также обнаружена сложная разветвленная цепочка тканевого дыхания (Cheah, 1967; Cheah, Prichard, 1975). По-видимому, сложная цепочка тканевого дыхания имеется и у трематоды *C. ijimai.*

Известно, что битионол эффективен при парамфистомидозах. Бенедиктовым было показано, что он тормозит активность ФР у фасциол. Активность этого фермента полностью тормозится битионолом и у *C. ijimai.* Однако нитропроизводное битионола, оксинид, не влияет на активность ФР. В этом отношении свойства каликофоронов отличны от ФР *F. hepatica*, активность которой полностью тормозится оксинидом (Бенедиктов, 1974). Производные салициланилидов, препараты Г-937 и Г-1026, также полностью тормозили транспорт электронов на сукцинат, очевидно, влияя на сопряженное с действием ФР фосфорилирование. В опытах на живых гельминтах все эти препараты были активны, убивали гельминтов через 36 ч. Поэтому все они заслуживают внимания как антгельминтные препараты.

Литература

Бенедиктов И. И. Транспорт электронов в митохондриях Fasciola hepatica. — Тр. ВИГИС, 1971, т. 17, с. 57—62.

Бенедиктов И. И. Влияние антгельминтных препаратов на биохимические системы трематоды Fasciola hepatica. — Мед. паразитол. и паразит. болезни, 1974, т. 43, № 6, с. 700—703.

Васильев А. А., Матузенко В. А., Горохов В. В., Платонов А. В., Ковалевский В. Б., Задорожный Г. Н., Артеменко Ю. Г., Мороз И. Я. Эффективность битионола при парамфистоматидозах крупного рогатого скота. — Ветеринария, 1967, № 12, с. 50—51.

Михайлицын Ф. С., Гику Г. А., Шведова В. И., Лычко Н. Д., Бехли А. Ф., Кротов А. И., Гладких В. Ф. Авторское свидетельство СССР № 807 609, Бюлл. изобретений, 1981, № 7.

Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М., Мир, 1977. 398 с.

Bryant C., Nicholas W. L. Studies on the oxidative metabolism of Moniliformis dubius. — Compar. Biochem. Physiol., 1966, vol. 17, N 3, p. 825—840.

Cheah K. S. Oxidative phosphorylation in Ascaris muscle mitochondria. — Comp. Biochem. Physiol., 1974, vol. 47B, N 2, p. 237—242.

Cheah K. S. The oxidase systems of Moniezia expansa (Cestoda). — Comp. Biochem. Physiol., 1967, vol. 23, N 2, p. 277—302.

Cheah K. S., Prichard R. K. Electron transport systems of Fasciola hepatica mitochondria. — Int. J. Parasitol., 1975, vol. 5, N 2, p. 183—186.

Fioravanti C. F., Saz H. J. «Malic» enzyme, Fumarate reductase and transhydrogenase systems in mitochondria of Adult Spirometra mansonoides (Cestoda). — J. Exp. Zool., 1978, vol. 206, N 2, p. 167—178.

Horecker B. L., Kornberg A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. — J. Biol. Chem., 1948, vol. 175, N 1, p. 385—390.

Köhler P. The transport of dicarboxylate and some properties of fumarase in the muscle mitochondria of Ascaris suum. — Int. J. Biochem., 1977, vol. 8, N 2, p. 141—147.

Köhler P., Saz H. J. Demonstration and possible function of NADH : NAD transhydrogenase from Ascaris muscle mitochondria. — J. Biol. Chem., 1976, vol. 251, N 8, p. 2217—2225.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Parr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—268.

Prichard R. K. Mode of action of the anthelmintic Thiabendazole in Haemonchus contortus. — Nature, 1970, vol. 228, N 14, p. 684—685.

Prichard R. K., Schofield P. J. A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in Fasciola hepatica and rat liver. — Comp. Biochem. Physiol., 1968, vol. 25, N 3, p. 1005—1019.

Saz H. J. Anaerobic phosphorylation in Ascaris mitochondria and the effects of anthelmintics. — Comp. Biochem. Physiol., 1971, vol. 39B, N 3, p. 627—638.

Soprunov F. F. Biochemie der Helminthen. I. Der Energiehaushalt der Helminthen. Parasitol. Schriftenr., 1978, N 23. 149 s.

Van Vugt F., Kalaycioglu L., van der Bergh S. G. ATP production in Fasciola hepatica mitochondria. — In: Biochemistry of parasites and host — parasite relationships (Ed. van den Bossche H.), 1976, p. 151—158.

Zoeten L. W., Tipker J. Intermediary metabolism of the liver fluke Fasciola hepatica, II. Hydrogen transport and phosphorylation. Hoppe — Seyler's. — Z. Physiol. Chem., 1969, vol. 350, N 6, p. 691—695.

MITOCHONDRIAL FUMARATE REDUCTASE IN THE TREMATODE CALICOPHORON IJIMAI

G. V. Yarygina, N. P. Vykhrestyuk, E. A. Burenina

SUMMARY

The presence of active fumarate reductase system in mitochondria of the trematode *Calicophoron ijimai* was shown. Fumarate reductase activities in different collections of *C. ijimai* vary considerably. Maximum activity accounts for 47.7 ± 1.0 nM/min/mg protein whereas minimum — for 15.1 ± 0.1. Some properties of the enzyme were studied.

The effect of thiabendazole, bitionol, oxinid and preparations of G-1026 and G-937 on the fumarate reductase activity was investigated. G-1026, G-937 preparations and bitionol have the strongest inhibitory effect on the enzyme. Thiabendazole inhibited but little the fumarate reductase reaction in *C. ijimai*. The enzyme activity was not affected by oxinid.